

URSZULA ZŁOTEK, URSZULA GAWLIK-DZIKI

WPLYW KWAŚNEJ HYDROLIZY NA WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCE ALKOHOLOWYCH EKSTRAKTÓW WYBRANYCH PRZYPRAW

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu zmiennych warunków pH (analogicznych do panujących w przewodzie pokarmowym człowieka) na zawartość związków fenolowych i aktywność przeciwutleniającą ekstraktów wybranych przypraw.

Materiałem badawczym były suszone przyprawy: cynamon (*Cinnamomum verum*), estragon (*Artemisia dranunculus*) i bazylia (*Ocimum basilicum*). Z przypraw sporządzono ekstrakty metanolowe, które poddano hydrolizie w zmiennych warunkach pH, symulujących warunki panujące w przewodzie pokarmowym. W próbach przed i po trawieniu oznaczono aktywność przeciwrodnikową, zdolność do chelatowania metali, siłę redukcji oraz zdolność do hamowania autooksydacji kwasu linolowego. Przeprowadzono również jakościową i ilościową analizę związków fenolowych techniką HPLC.

Najwyższą aktywność przeciwrodnikową wykazał ekstrakt cynamonu (92,48%), ekstrakty pozostałych przypraw charakteryzowały się dużo niższą zdolnością do neutralizacji wolnych rodników DPPH (od 13,53 do 29,00%). Zmienne warunki pH spowodowały wzrost zdolności do chelatowania we wszystkich badanych próbach. Trawienie w symulowanym układzie *in vivo* przyczyniło się również do wzrostu zdolności do hamowania autooksydacji kwasu linolowego. Przy określaniu zdolności do redukcji zaobserwowano tendencję odwrotną – trawienie *in vitro* spowodowało zmniejszenie tej zdolności we wszystkich badanych przyprawach.

Słowa kluczowe: cynamon, estragon, bazylia, związki fenolowe, aktywność przeciwutleniająca

Wprowadzenie

Żywność pochodzenia roślinnego odgrywa w żywieniu człowieka istotną rolę, ponieważ stanowi źródło metabolitów wtórnych o specyficznym oddziaływaniu na procesy fizjologiczne. W tej grupie bardzo popularne są rośliny przyprawowe, które dodawane do posiłków nie tylko zwiększają ich atrakcyjność sensoryczną, ale wpływają też na prozdrowotne właściwości pożywienia [5]. Przyprawy są bogatym źródłem

różnych klas związków biologicznie aktywnych, w tym polifenoli, głównie flawonoidów wykazujących szeroko udokumentowane właściwości przeciwutleniające [7, 18] i przeciwdziałające chorobom cywilizacyjnym [15]. Kanner i Lapidot [10] sugerują, że ludzki płyn gastryczny jest środowiskiem wzmagającym peroksydację związków pochodzących z surowców roślinnych. Mechanizm działania wielu składników przypraw poznano na poziomie molekularnym, niewiele jest jednak doniesień na temat interakcji pomiędzy nimi a innymi składnikami żywności, przemian jakim podlegają podczas produkcji i przechowywania żywności oraz ich biodostępności.

Celem pracy było określenie wpływu zmiennych warunków pH (analogicznych do panujących w przewodzie pokarmowym człowieka) na zawartość związków fenolowych i aktywność przeciwutleniającą ekstraktów wybranych przypraw.

Materiał i metody badań

Materiałem badawczym były suszone przyprawy dostępne na rynku: cynamon (*Cinnamomum verum*), estragon (*Artemisia dranunculus*) i bazylia (*Ocimum basilicum*). Naważki w ilości 1 g ekstrahowano wrzącym metanolem (100 ml). Następnie 50 ml ekstraktu przenoszono ilościowo do kolby stożkowej, zakwaszono 5M HCl do pH 2 i inkubowano przez 60 min wytrząsając (bez dostępu światła i tlenu) w temp. 37°C. Po tym czasie zobojętniano 0,1M NaOH do pH 7 i kontynuowano inkubację przez 120 min. Z uwagi na śladową zawartość białek nie zastosowano enzymów trawiennych, takich jak pepsyna i pankreatyna. W próbach przed i po hydrolizie oznaczano aktywność przeciworodnikową z zastosowaniem trwałego wolnego rodnika DPPH [2], zdolność do chelatowania metali metodą Guo i wsp. [6], siłę redukcji metodą Oyaizu [17] oraz zdolność do hamowania autooksydacji kwasu linolowego metodą Lingnerta i wsp. [14].

Określano także całkowitą zawartość polifenoli (reakcja z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a [23]) i wyrażano jako ekwiwalent kwasu galusowego (mg GAE/ml). Sumę flawonoidów oznaczano metodą Lamaisona [1] i wyrażano jako ekwiwalent kwercetyny (mg QE/ml). Przeprowadzono również jakościową i ilościową analizę związków fenolowych w badanych ekstraktach techniką HPLC wg procedury opisanej przez Li i wsp. [13] w niewielkiej modyfikacji własnej. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono przy użyciu chromatografu Varian z detektorem Pro star 325 UV-Vis, w kolumnie Varian ChromSpher C18 (25 mm x 4,6 mm). Zastosowano nieliniowy gradient stężeń w układzie: 1% kwas octowy (A) – 100% metanol (B), przy przepływie 0,8 ml/min. Rozdział prowadzono w gradiencie: 0 min, 5% B; 5 min, 5% B; 15 min, 15% B; 30 min, 30% B; 40 min, 35% B; 50 min, 70% B; 55 min, 100% B. Do identyfikacji związków fenolowych użyto roztworów wzorcowych, a oznaczenie wykonywano poprzez pomiar absorbancji przy $\lambda = 290$ nm. Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

Ekstrakty badanych przypraw charakteryzowały się zbliżoną zawartością związków fenolowych, wynoszącą od 0,54 mg/ml (estragon) do 0,70 mg/ml (cynamon). Trawienie *in vitro* spowodowało wzrost całkowitej zawartości związków fenolowych we wszystkich próbach. Tendencja ta wystąpiła zwłaszcza w przypadku ekstraktu z cynamonu, a w najmniejszym stopniu – w przypadku ekstraktu z bazylii (tab. 1).

Tabela 1

Wyniki jakościowej i ilościowej analizy ekstraktów przypraw niepoddanych i poddanych trawieniu.
Results of the qualitative and quantitative analyses of spice extracts prior to and after the digestion process.

Składnik Compound	Ekstrakty niepoddane trawieniu [µg/ml ekstraktu] Extracts prior to digestion [µg/ml extract]				Ekstrakty po trawieniu [µg/ml ekstraktu] Extracts after the digestion [µg/ml extract]		
	RT	cynamon cinnamon	estragon tarragon	bazyliia basil	cynamon cinnamon	estragon tarragon	bazyliia basil
Kwas kawowy Caffeic acid	28,00	2,00±0,01	0,33±0,01	1,56±0,48	0,00	0,41±0,03	0,17±0,08
Kwas ferulowy Ferulic acid	39,43	0,14±0,01	0,00	0,20±0,05	0,05±0,001	0,00	0,00
Kwas synapinowy Sinapic acid	39,38	0,53±0,01	0,00	0,81±0,26	0,17±0,01	0,11±0,01	0,17±0,02
Kwas salicylowy Salicylic acid	46,41	0,32±0,005	2,20±0,32	1,21±0,36	0,64±0,54	0,74±0,21	0,77±0,25
Kwas t-cynamonowy T-cinnamic acid	53,07	63,96±0,51	0,62±0,07	0,16±0,03	8,72±0,81	0,59±0,08	0,35±0,06
Daidzeina Daidzein	51,55	0,00	0,00	2,04±0,61	0,00	1,36±0,41	0,00
Kwercetyna Quercetin	52,97	0,59±0,01	0,00	61,09±0,74	0,00	0,00	0,34±0,01
Kempferol Kaempferol	54,33	84,68±0,56	0,10±0,005	0,56±0,09	0,00	0,00	6,60±0,31
Całkowita zawartość związków fenolowych [mg GAE/ml] Total content of phenolic compounds [mg GAE/ml]		0,70±0,06	0,54±0,06	0,64±0,02	8,05±0,08	1,42±0,16	0,72±0,07
Całkowita zawartość flawonoidów [mg QE/ml] Total content of flavonoids [mg QE/ml]		1,27±0,53	0,71±0,15	0,41±0,02	0,19±0,05	0,58±0,14	0,36±0,01

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe / In Tab., the mean values and standard deviations are show.

Największą zawartością flawonoidów charakteryzował się niehydrolizowany ekstrakt z cynamonu, najmniejszą – ekstrakt z bazylii (tab. 1). Po kwaśnej hydrolizie i ponownej alkalizacji badanych ekstraktów zawartość tych związków zmniejszyła się. Największe straty zaobserwowano w przypadku cynamonu, najmniejsze zaś w przypadku ekstraktu z bazylii. Justesen i Knutsen [8], analizując skład ekstraktów poddanych kwaśnej hydrolizie, stwierdziły, że w ekstrakcie z estragonu znajdowała się kwercetyna, kempferol, luteolina i izoramnetyna, natomiast w niniejszej pracy potwierdzono jedynie obecność kempferolu (w próbie bez hydrolizy), natomiast w ekstrakcie po trawieniu zidentyfikowano tylko daidzeinę. Cytowane autorki nie potwierdziły występowania flawonoidów w ekstrakcie z bazylii, natomiast wyniki własne wskazują na obecność w ekstrakcie tej przyprawy kwercetyny, kempferolu i daidzeiny.

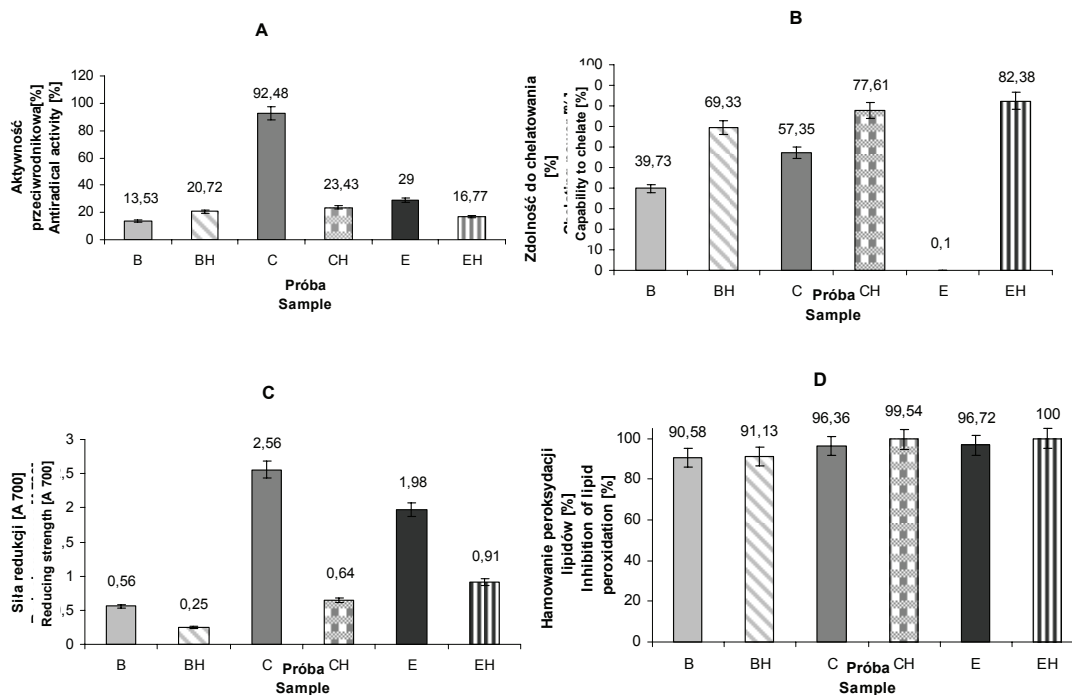
Kosar i wsp. [12], badając wpływ pH na skład i aktywność metanolowych ekstraktów przypraw, stwierdzili, że kwaśna hydroliza spowodowała znaczący wzrost zawartości polifenoli w ekstraktach z tymianku, szalwi, rozmarynu i oregano, natomiast w przypadku ekstraktu z bazylii odnotowano spadek zawartości związków fenolowych, jednak w cytowanej pracy nie przeprowadzono ponownej alkalizacji. Rezultaty otrzymane w niniejszej pracy wykazały, że związki fenolowe uwolnione podczas trawienia w warunkach zbliżonych do panujących w żołądku są stabilne w alkalicznym pH (tab. 1). Record i Lane [20], badając wpływ trawienia *in vitro* na skład i aktywność przeciwutleniającą ekstraktów z czarnej i zielonej herbaty, stwierdzili, że zawartość związków fenolowych wzrastała po kwaśnej hydrolizie (w warunkach symulujących panujące w żołądku), natomiast malała w miarę upływu czasu inkubacji w pH = 7,5. Autorzy tłumaczą to możliwością powstawania dimerów, które są niestabilne w alkalicznym pH.

Nietrawione ekstrakty z przypraw wykazywały średnią zdolność do neutralizacji wolnych rodników DPPH z wyjątkiem ekstraktu z cynamonu, którego aktywność była najwyższa i wynosiła ponad 90%. Trawienie spowodowało zmniejszenie aktywności prób z cynamonu i estragonu, podczas gdy aktywność ekstraktu bazylii wzrosła (rys. 1A).

Przed trawieniem ekstrakt estragonu wykazywał bardzo niską zdolność do chelataowania w porównaniu z aktywnością pozostałych prób, która była znacznie wyższa i wynosiła 39,73% w przypadku bazylii i 57,35% - cynamonu. Trawienie spowodowało wzrost aktywności wszystkich prób, przy czym najwyższą aktywność nadal wykazał ekstrakt estragonu (rys.1B).

Spośród nietrawionych ekstraktów najwyższą zdolnością do redukcji charakteryzowała się próba z cynamonu (2,56). Mathew i Abraham [16], analizując aktywność metanolowego ekstraktu cynamonu, stwierdzili, że zdolność do redukcji była wprost proporcjonalnie zależna od stężenia ekstraktu. Aktywność pozostałych prób była zbliżona i wynosiła około 0,64. Trawienie spowodowało zmniejszenie aktywności wszyst-

kich prób. Największe zmniejszenie aktywności zaobserwowano w przypadku próby z cynamonu (rys. 1C). W badaniach Kosar i wsp. [12] również odnotowano zmniejszenie aktywności ekstraktu z bazylii po kwaśnej hydrolizie, podczas gdy aktywność pozostałych prób wzrosła. Zaznaczyć jednak należy, że cytowani autorzy nie alkalizowali ponownie analizowanych prób.



Objaśnienia: / Explanatory notes:

B – bazylia / basil; BH – bazylia po hydrolizie / basil after the hydrolysis; C – cynamon / cinnamon, CH – cynamon po hydrolizie / cinnamon after the hydrolysis; E – estragon / tarragon, EH – estragon po hydrolizie / tarragon after the hydrolysis.

Rys. 1. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów badanych przypraw: aktywność przeciwnokowa (A), zdolność do chelatowania (B), siła redukcji (C), inhibicja autooksydacji lipidów (D).

Fig. 1. Antioxidant activity of spice extracts studied: antiradical activity (A), capability to chelate (B), iron reduction strength (C), and inhibition of the lipid auto-oxidation (D).

Wszystkie badane ekstrakty wykazały ponad 90% zdolność do hamowania peroksydacji lipidów. Trawienie spowodowało wzrost aktywności wszystkich ekstraktów, przy czym w najmniejszym stopniu dotyczyło to ekstraktu z bazylii (rys.1D). Mathew i Abraham [16] wykazali, że ekstrakt uzyskany z cynamonu przy użyciu 50% metanolu bardzo skutecznie hamował samoutlenianie kwasu linolowego (ponad 80% po 24 h

inkubacji). Podobnie Sobhan i Akhilender Naidu [22] potwierdzili wysoką skuteczność metanolowego ekstraktu z cynamonu.

Powszechnie uważa się, że w celu określenia potencjału przeciwutleniającego konieczne jest, oprócz zastosowania wielu metod oznaczania aktywności przeciwutleniającej, uwzględnienie zawartości i rodzaju związków fenolowych. Wykonano wiele prac mających na celu określenie zależności pomiędzy strukturą związków fenolowych a aktywnością przeciwutleniającą, ale zależności te nie zostały w pełni wyjaśnione [3, 21]. Gazzani i wsp. [4] oraz Kähkönen i wsp. [9] nie stwierdzili żadnej korelacji pomiędzy zawartością związków fenolowych a aktywnością przeciwutleniającą ekstraktów roślin. Według nich, różne związki fenolowe powodują odmienne reakcje przy oznaczaniu metodą Folina-Ciocalteu, więc całkowita zawartość związków fenolowych nie może być uważana za wyznacznik aktywności przeciwutleniającej danego ekstraktu. W niniejszej pracy stwierdzono występowanie silnej dodatniej korelacji pomiędzy zawartością flawonoidów a zdolnością przeciwrodnikową oraz zdolnością do redukcji (R wynosił, odpowiednio, 0,76 i 0,82), nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy całkowitą zawartością związków fenolowych a aktywnością przeciwutleniającą niezależnie od metody jej oznaczania. Wielu badaczy wskazuje na istnienie silnej zależności pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą a metodą używaną do jej oznaczenia [19, 24]. Kaur i Kapoor [11] uznali za bardziej uzasadnione określanie właściwości przeciwutleniających warzyw przy zastosowaniu rozmaitych metod niż bazowanie na wsynikach uzyskanych przy zastosowaniu tylko jednego sposobu ich określania. Również wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na różnorodność mechanizmów działania przeciwutleniaczy zawartych w badanym surowcu.

Wnioski

1. Hydroliza *in vitro* spowodowała wzrost zawartości polifenoli i zmniejszenie zawartości flawonoidów we wszystkich badanych ekstraktach.
2. Zdolność do chelatowania jonów żelaza(II) oraz zdolność do hamowania samoutleniania kwasu linolowego we wszystkich badanych ekstraktach była wyższa po hydrolizie, natomiast zdolność do redukcji była wyższa przed hydrolizą *in vitro*.
3. Ekstrakty z cynamonu i estragonu poddane hydrolizie *in vitro* wykazywały znacznie niższą zdolność do neutralizacji stabilnych rodników DPPH niż ekstrakty nie-trawione.
4. Stwierdzono istnienie dodatniej korelacji pomiędzy zawartością flawonoidów w badanych ekstraktach a ich aktywnością przeciwrodnikową oraz zdolnością do redukcji.

Praca była prezentowana podczas XII Ogólnopolskiej Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Lublin, 23–24 maja 2007 r.

Literatura

- [1] Bohorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vaseur J., Cazin M., Cazin J.-C., Pinkas M.: Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim-Forsch./Drug Res.*, 1996, **46 (II)**, 1086-1089.
- [2] Brand-Williams W., Cuvelier E., Berset C. M.: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss. U- Technol*, 1995, **28**, 25-30.
- [3] Cuvelier M.E., Rihard H., Berset C.: Comparison of the antioxidative activity of some-acid-phenols-structure activity relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1992, **56**, 324.
- [4] Gazzani G., Papetti A., Massolini G., Daglia M.: Anti- and prooxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and effect of thermal treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 4118-4122.
- [5] Góra J.: Hedonistyczne i zdrowotne aspekty aromatów spożywczych i przypraw. *Magazyn Przem. Spoż.*, 2000, **3 (7)**, 23-28.
- [6] Guo J.-T., Lee H.-L., Chiang S.-H., Lin H.-I., Chang C.-Y.: Antioxidant properties of the extracts from different parts of broccoli in Taiwan. *J. Food Drug Anal.*, 2001, **9 (2)**, 96-101.
- [7] Hinneburg I., Dorman H. J. D., Hiltunen R.: Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.*, 2006, **97**, 122-129.
- [8] Justesen U., Knutsen P.: Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chem.*, 2001, **73**, 245-250.
- [9] Kähkönen M.P., Hopia A.T., Vuorela H.J., Rauha J.-P., Pihlaja K., Kujala T.S.: Heinonen M.: Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 3954-3962.
- [10] Kanner J., Lapidot T.: The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.*, 2001, **31(11)**, 1388-1395.
- [11] Kaur C., Kapoor H.C.: Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2002, **37**, 153-161.
- [12] Koşar M., Dorman H. J. D., Hiltunen R.: Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chem.*, 2005, **91**, 525-533.
- [13] Li W, Shan F, Sun S, Corke H, Beta T. Free radical scavenging properties and phenolic content of chinese black-grained wheat. *J Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 8533-8536.
- [14] Lingnert H., Vallentinn K., Eriksson C. E.: Measured of antioxidative effect in model system. *J. Food Proc.Preserv.*, 1979, **3 (87)**, 103.
- [15] Małolepsza U., Urbanek H.: Flawonoidy roślinne jako związki biochemicznie czynne. *Wiadomości Botaniczne*, 2000, **44 (3/4)**, 27-37.
- [16] Mathew S., Abraham T. E.: Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extract, through various in vitro models. *Food Chem.*, 2006, **94**, 520-528.
- [17] Oyaizu M.: Studium on products of browning reaction – Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap. J Nutr.*, 1986, **44**, 307-315.
- [18] Peter K. V.: Handbook of herbs and spices. Published by Woodhead Publishing Limited. Cambridge, Abington, 2001.
- [19] Peterson D.M., Emons C.L., Hibbs A.: Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. *J. Cereal Sci.*, 2001, **25**, 97-103.
- [20] Record I. R., Lane J.M.: Simulated intestinal digestion of green and black teas. *Food Chem.*, 2001, **73**, 481-486.
- [21] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, **20 (7)**, 933-956.

- [22] Shobana S., Akhilender Naidu K.: Antioxidant activity of selected Indian spices. Prostaglandins, Leukotrienes and essential fatty acids, 2000, **62** (2), 107-110.
- [23] Singleton V. L., Rossi J. A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic., 1965, **16**, 144-158.
- [24] Von Gadow A., Joubert E., Hansmann C.F.: Comparison of the antioxidant activity of Aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherols, BHT and BHA., J. Agric. Food Chem., 1997, **45** (3), 632-638.

EFFECT OF ACIDIC HYDROLYSIS ON THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF ALCOHOLIC EXTRACTS FROM THE SELECTED SPICES

S u m m a r y

The objective of the research was to determine the effect of varying pH conditions (analogous to those within the human digestive tract) on the content of phenolic compounds and on the antioxidant activity of extracts from some selected spices.

The research material consisted of the following dried spices: cinnamon (*Cinnamomum verum*), tarragon (*Artemisia dranunculus*), and basil (*Ocimum basilicum*). From those species, methanol extracts were made and hydrolyzed under the varying pH conditions, which simulated the conditions within the human digestive tract. In the samples taken prior to and after the digestion process, the following was determined: antiradical activity, iron chelation, iron reduction strength, and capability to inhibit auto-oxidation of the linolic acid. Furthermore, qualitative and quantitative analyses of the phenolic compounds were performed using an HPLC technique.

The extract of cinnamon showed the highest antiradical activity (92,48%), the extracts from the remaining species were characterized by an essentially lower capability to neutralize free DPPH radicals (from 13.53% to 29%). The varying pH conditions caused the increase in the chelating capability of all the samples analyzed. The digestion process in a simulated *in vivo* system also contributed to the increase in the capability to inhibit auto-oxidation of the linolic acid. While determining the reducing capability of spices studied, an opposite tendency was found, namely, the *in vitro* digestion process caused the decrease in the reducing capability of all the spices studied.

Key words: cinnamon, tarragon, basil, phenolic compounds, antioxidant activity ☒